

## Über die Transformation von $\gamma$ -Tocopherol zu $\alpha$ -Tocopherol im tierischen Organismus; ein Generationsversuch an Ratten\*)

I. Elmadfa, S.-W. Kim, M. Reutlinger und R. Siewert

Institut für Ernährungswissenschaft, Gießen

**Zusammenfassung:** Die Biosynthese des  $\alpha$ -Tocopherols, des wirksamsten Vitamins innerhalb der Vitamin-E-Gruppe, ist beschränkt auf höhere Pflanzen und Mikroorganismen. Wegen des Fehlens des Shikimatweges vermag der tierische Organismus das  $\alpha$ -Tocopherol nicht zu bilden. Auch eine vollständige enterale Synthese ist nicht bekannt. Es wird angenommen, daß die Umwandlung im Tierkörper von Dimethyltocol zum Trimethyltocol möglich sei.

In einem Experiment an Ratten über vier Generationen wurde folgenden Fragen nachgegangen:

- Findet eine Umwandlung von  $\gamma$ - zu  $\alpha$ -Tocopherol statt?
- Ändert sich die Effizienz der Transformation auf Gewebs- und Organebene bzw. im gesamten Körper über die Generationen?
- Welche Rolle spielt die Darmflora?
- Kann die Effizienz der Transformation durch zusätzliche Gaben an  $\text{CH}_3$ -Gruppen verbessert werden?

Über vier Generationen erhielten Wistaratten eine halbsynthetische Grunddiät mit 78,8 mg DL- $\gamma$ -Tocopherol/kg ( $F_1$ – $F_3$ ). In  $F_4$  erhielt ein Teil der Tiere die tocopherolfreie Grunddiät,  $\gamma$ -Tocopherol (ca. 1,5 mg, alle zwei Tage) wurde den Tieren subkutan verabreicht. Weitere zwei Kollektive bekamen mit dem Grundfutter  $\gamma$ -Tocopherol (wie in  $F_1$ – $F_3$ ) und zusätzlich Methionin (0,24 %) bzw. Cholin (0,45 %) oral verabreicht. In einer Ganzkörperanalyse in  $F_1$ – $F_3$  und in Serum, Erythrozyten, Leber, Herz, Lunge, Darm, Gonaden und Kot wurden  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol mittels HPTLC bestimmt. Das Verhältnis  $\alpha$ - $\gamma$ -Tocopherol ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ) und die Vitamin-E-Wirksamkeit ( $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Tocopheroläquivalente/ml bzw. g FS od. g TS) wurden errechnet.

Bis zur 4. Filialgeneration waren Wachstum und Fortpflanzungsfähigkeit normal; keine äußereren oder anatomischen Abnormitäten wurden beobachtet.

Im Gesamtkörper und in Geweben und Organen der Generationen  $F_1$ – $F_4$  wurde  $\alpha$ -Tocopherol gefunden. Gemessen an den Ergebnissen der Ganzkörperanalyse nahm die Vitamin-E-Wirksamkeit in  $F_2$  um 25 % und in  $F_3$  um 70 % ab. Die Effizienz der  $\gamma$ -Tocopheroltransformation stieg dagegen um 23 % in  $F_2$  und 168 % in  $F_3$ . Höchste Transformationsraten wurden in  $F_2$  und  $F_3$  für Kot, gefolgt von Gonaden und Lunge, festgestellt, die niedrigsten für Serum und Leber.

Durch die subkutane  $\gamma$ -Tocopherolapplikation war die Transformationsrate im Kot in  $F_4$  um Faktor 4 schlechter als in  $F_3$ . Die Effizienz der Transformation und die Vitamin-E-Wirksamkeit nahmen in Herz, Dickdarm, Lunge und Serum zu. Ebenso besser fielen die Werte für diese Parameter unter der Mehrzufuhr an Methionin und Cholin, wobei sich mit beiden Methylgruppendonatoren die gleiche positive Wirkung erzielen ließ.

\*) Herrn Prof. Dr. med. Karl Heinz Bässler zum 65. Geburtstag gewidmet.

Die Ergebnisse zeigten, daß sich der Körper an eine  $\gamma$ -Tocopherolzufuhr über Generationen adaptieren kann.  $\gamma$ -Tocopherol dient auch im tierischen Organismus als unmittelbare Vorstufe der  $\alpha$ -Tocopherolsynthese. Dieser Syntheseschritt erfolgt wahrscheinlich über eine Transmethylierungsreaktion in den verschiedenen Geweben und Organen gemäß ihrem spezifischen Bedarf an  $\alpha$ -Tocopherol.

### The conversion of $\gamma$ -tocopherol to $\alpha$ -tocopherol in the animal organism; an experiment with rats over generations

**Summary:** The biosynthesis of  $\alpha$ -tocopherol, the most effective vitamer among the vitamin E-group, is found only in higher plants and microorganisms. Due to the lack of the shikimate pathway, animals are not able to synthesize  $\alpha$ -tocopherol. Also not found is a whole enteral synthesis; only the conversion of dimethyletocol to trimethyletocol seems to be possible.

Using four generations of rats, we sought to determine:

- Is a transformation of  $\gamma$ -tocopherol to  $\alpha$ -tocopherol in the animal body possible?
- Are there any differences in the transformation rates in organs, tissues, or in the entire body along the generations?
- Does gut flora play any role in the conversion of  $\gamma$ -tocopherol?
- Is it possible to increase the efficiency of the transformation by supplying additional  $\text{CH}_3$ -groups?

Wistar rats were fed a semisynthetic basal diet, supplemented with 78.8 mg DL- $\gamma$ -tocopherol/kg in the first three generations ( $F_1$ - $F_3$ ). In the fourth generation ( $F_4$ ), some of the animals were fed a vitamin E-free diet and  $\gamma$ -tocopherol (approx. 1.5 mg on alternate days) was injected s.c. Two other groups of animals received the basal diet containing additional methionine (0.25 %) or choline (0.45 %), as well as  $\gamma$ -tocopherol (as in  $F_1$ - $F_3$ ).

$\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol were analyzed by HPTLC in the whole body and in serum, liver, heart, lung, gut, gonads, and feces. The ratio of  $\alpha$ -/ $\gamma$ -tocopherol ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ) as transformation rate and vitamin E-biopotency ( $\mu\text{g } \alpha\text{-tocopherol equivalents/g}$ ) were calculated.

Growth and fertility were normal until the fourth generation; no abnormal developments could be recognized.

$\alpha$ -tocopherol was found in the whole-body as well as in all tissues and organs. In the whole-body, vitamin E-biopotency decreased 25–70 % in  $F_2$  and  $F_3$ . On the other hand, the increase of the transformation rate of  $\gamma$ - to  $\alpha$ -tocopherol amounted to 23 % ( $F_2$ ) and 168 % ( $F_3$ ). Highest conversion rates were found in  $F_2$  and  $F_3$  for feces, followed by gonads and lungs; the lowest rates were found for serum and liver.

Due to the s.c.-injection of  $\gamma$ -tocopherol, feces showed a four-times lower transformation rate in  $F_4$  than in  $F_3$ . There was an increase in heart, gut, lung and serum for both transformation rate and vitamin E-biopotency. These parameters could be improved also by the additional supplements of methionine and choline. Both methyl-group-donators revealed nearly the same positive effect.

The results show that the animal organism can adapt to  $\gamma$ -tocopherol supply over generations.  $\gamma$ -tocopherol seems to be a direct precursor for the  $\alpha$ -tocopherol synthesis. The methylation of  $\gamma$ -tocopherol in the organs and tissues occurs, presumably, according to their specific  $\alpha$ -tocopherol requirement.

**Schlüsselwörter:**  $\gamma$ -Tocopherol; Transformation;  $\alpha$ -Tocopherol; Ratten; Generationsversuch

**Key words:**  $\gamma$ -tocopherol; transformation;  $\alpha$ -tocopherol; rats; generation-experiment

## Einleitung

In der Natur kommen verschiedene Verbindungen mit unterschiedlicher Vitamin-E-Wirksamkeit vor, sie werden als Tocopherole oder Tocotrienole bezeichnet.

Sie alle sind Derivate des Chromans und enthalten eine OH-Gruppe in Stellung 6 und eine isoprenoide C<sub>16</sub>-Seitenkette in Stellung 2 des Chromanrings, die bei den Tocopherolen gesättigt und bei den Tocotrienolen dreifach ungesättigt ist. Die Grundstruktur – Chromanring und Seitenkette – wird als Tocol bezeichnet. Die Tocopherole und ihre korrespondierenden Tocotrienole unterscheiden sich lediglich durch Anzahl und Stellung der Methylgruppen am Chromanring. Man kennt heute  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherole und die entsprechenden Tocotrienole (Abb. 1).

## Biosynthese der Tocopherole

### 1 In der Pflanze

Die Aufklärung der Biosynthese der Tocopherole (= Tocochromanole) ging Hand in Hand mit den verwandten Verbindungen der Tocochinone, Plastochinone und Plastochromanole. Aufschluß über die Details des Syntheseweges erlangte man in radiochemischen Experimenten – incorporation studies, isotope competition experiments –, in denen die Aufnahme von radioaktiv markierten Molekülen in den obengenannten Stoffgruppen getestet wurde.

Der aromatische Ring der Tocopherole wird vom Tyrosinzweig der Shikimisäuresynthese gebildet (18, 21). Aus der Shikimisäure entsteht die 4-Hydroxybrenztraubensäure, deren Bildung in höheren Pflanzen in diesem Zusammenhang unerlässlich ist und auch aus der Oxidation von Tyrosin resultieren kann. Unter Einwirkung der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, eines im Stroma und in der Hüllmembran der Chlоро-

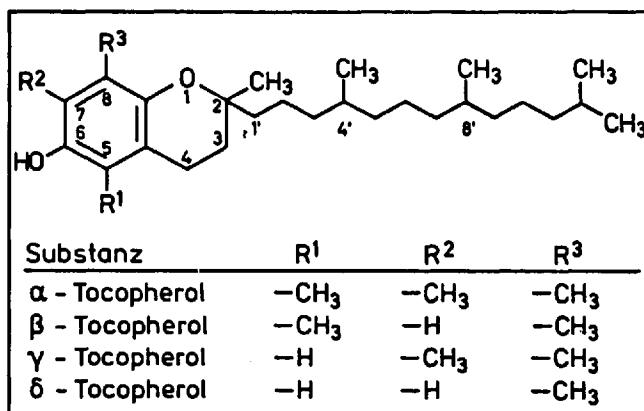


Abb. 1. Struktur der natürlich vorkommenden Tocopherole.

plasten lokalisiertes Enzym, wird sie zu Homogentisinsäure oxidiert (6, 20, 21).

Die isoprenoide Seitenkette wird auf dem bekannten Weg der Terpensynthese gebildet. Über Mevalonsäure entsteht aus Acetyl-Co A Geranylgeranyldiphosphat, das wiederum zu Phytolpyrophosphat hydriert werden kann (13, 18, 20) (Abb. 2).

Die Prenylierungsreaktion stellt eine Schlüsselreaktion im Rahmen der Tocopherolsynthese dar. Hierbei werden zur Bildung von  $\alpha$ -Tocopherol zwei Synthesewege vorgeschlagen: der Tocopherolweg und der Tocotrienolweg.

Im Tocopherolweg kondensiert die Homogentisinsäure mit dem Phytolrest von Phytolpyrophosphat. Diese hochspezifische Prenylierungsreaktion wird von der Homogentisinsäure-Decarboxylase-Polyprenyl-Transfe-

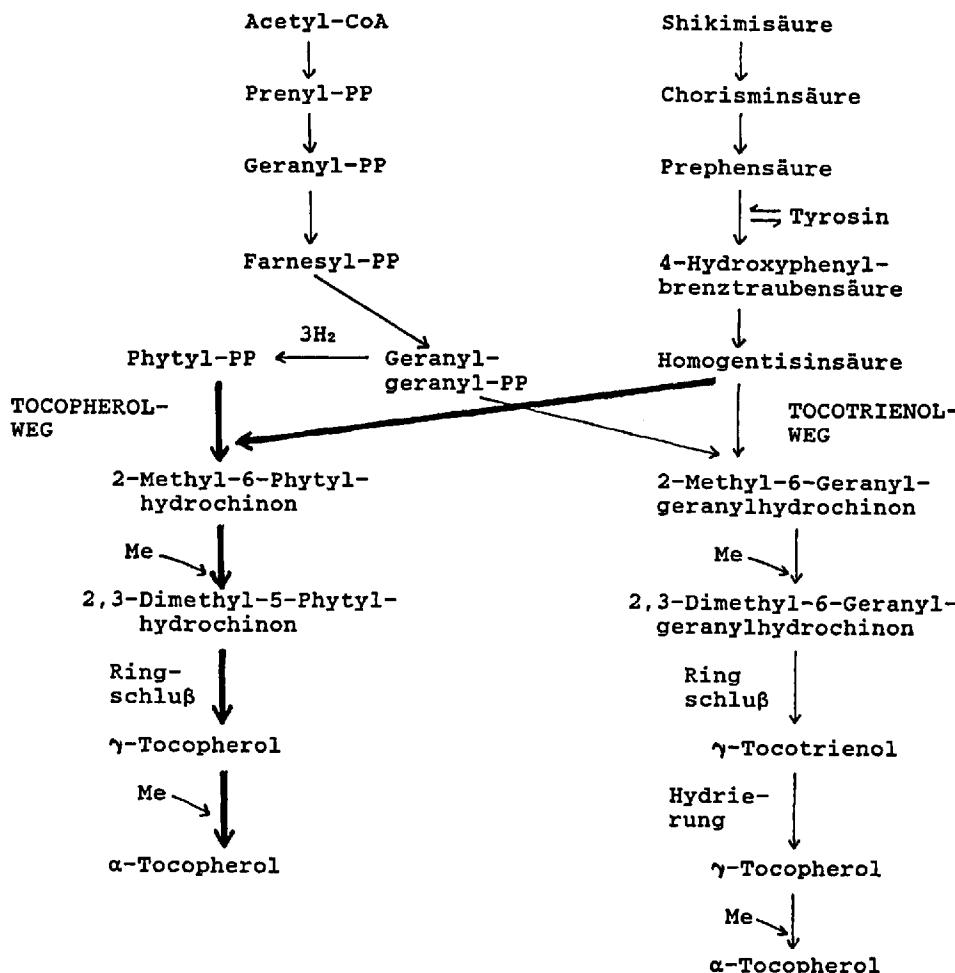


Abb. 2.  $\alpha$ -Tocopherol-Biosynthese: Tocopherolweg und Tocotrienolweg.

rase gesteuert und führt nach Abspaltung einer Carboxylgruppe zur Bildung von 2-Methyl-6-Phytolhydrochinon. Nach Methylierung zum 2,3-Dimethyl-6-Phytolhydrochinon erfolgt die Zykлизierung zum  $\gamma$ -Tocopherol. Durch die Einführung einer weiteren Methylgruppe entsteht das  $\alpha$ -Tocopherol (13, 15).

Gemäß dem *Tocotrienolweg* reagiert die Homogentisinsäure mit Geranylpyrophosphat zu 2-Methyl-6-Geranylgeranyl-Hydrochinon. Dieses wird zum 2,3-Dimethyl-6-Geranylgeranylhydrochinon methyliert, weiter zum  $\gamma$ -Tocotrienol zykлизiert und durch Hydrierung zu  $\gamma$ -Tocopherol abgesättigt. Nach erneuter Methylierung entsteht  $\alpha$ -Tocopherol (12, 14, 15).

Soll et al. (17) zeigten, daß die Synthesewege in der Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert sind und dieselben Enzymsysteme beinhalten, jedoch mit unterschiedlicher Affinität.

In vielen Untersuchungen erwies sich das  $\gamma$ -Tocopherol als die direkte Vorstufe von  $\alpha$ -Tocopherol, wohingegen das  $\beta$ -Isomer keinen gemeinsamen Syntheseweg mit  $\alpha$ -Tocopherol aufzuweisen scheint (2).

## 2 Im Tierkörper

Für den tierischen Organismus stellt das Tocopherol einen essentiellen Nährstoff dar, weil die Tiere wegen des Fehlens des für den Stoffwechsel der Pflanzen und einigen Mikroorganismen typischen Shikimatweges zur Synthese des aromatischen Ringes nicht befähigt sind (16). Auch eine vollständige enterale Tocopherolsynthese durch die Darmbakterien ist nicht bekannt.

Transformationen innerhalb der einzelnen Tocopherole sind im Tierkörper denkbar. Während sie bei Legehennen und Regenbogenforellen ausgeschlossen werden konnten (3, 19), wurden solche Transformationen für Säugetiere mit den Untersuchungen von Emmel und La Celle (5) 1959 am Beispiel der Ratte bestätigt. In einem kurzen Kongreßbeitrag berichteten sie über ihre Befunde. Die Autoren verabreichten entwöhnten Ratten einer Generation, die 13–15 Wochen lang tocopherolfrei ernährt wurden,  $\gamma$ -Tocopherol (25 mg/d für 10 Tage oder 25 mg alle zwei Tage für 2–4 Wochen). Die Gewebe der Tiere wiesen dann Tocopherolgehalte auf, die vergleichbar mit denen normal ernährter Ratten waren. Bei den Vitamin-E-Mangel-Tieren (ohne  $\gamma$ -Tocopherolgaben) lagen die Tocopherolkonzentrationen der Gewebe bei etwa 10 % der Normaltiere. In den Geweben aller Tiere, denen für 10 Tage und länger  $\gamma$ -Tocopherol verabreicht wurde, wurde  $\alpha$ -Tocopherol nachgewiesen.

Nun ist es bekannt, daß der Nachwuchs von Vitamin-E-Mangel-Tieren zwar einen ausgeprägten Tocopherolmangel zeigt. Über die Plazenta und mit der Muttermilch erhält das Jungtier von der Mutter jedoch kleine Mengen an  $\alpha$ -Tocopherol, die trotz des nachweisbaren Vitamin-E-Mangels analytisch noch erfaßt werden können.

Können die Befunde von Emmel und La Celle als Beweis für eine stattgefundene Transformation von  $\gamma$ - zu  $\alpha$ -Tocopherol gelten?

## Fragestellung

Um die im Zusammenhang mit den Arbeiten von Emmel und La Celle erhobene Frage zu beantworten, wurde die mögliche Fähigkeit des Säuge-

tierkörpers,  $\gamma$ - in  $\alpha$ -Tocopherol umzuwandeln, in einem Experiment an Ratten über 4 Generationen untersucht. Dabei waren folgende Fragen von grundsätzlichem Interesse:

- Findet eine Umwandlung auch über Generationen von  $\gamma$ -Tocopherol zu  $\alpha$ -Tocopherol im Körper statt?
- Ändert sich die Effizienz der Transformation von  $\gamma$ -Tocopherol auf Gewebs- und Organebene bzw. im gesamten Körper über die Generationen?
- Welche Rolle spielt hierbei die Darmflora?
- Da es sich bei der Transformation um eine Übertragung einer Methylgruppe auf das  $\gamma$ -Tocopherolmolekül handelt, wird die Umwandlung effizienter, wenn mehr Methylgruppen in Form von Methylgruppendonatoren dem Körper zugeführt werden?

## Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden Wistaratten beiderlei Geschlechts verwendet. Tiere der Elterngeneration ( $F_0$ ) wurden nach Absetzen von der Mutter mit einer DL- $\gamma$ -tocopherolhaltigen (78,8 mg/kg = 0,189 mmol) halbsynthetischen Diät (Tab. 1) ernährt. Durch Paarung von Geschwistertieren dieser Generation und den darauf folgenden drei Filialgenerationen wurden Individuen der Generationen  $F_1$ – $F_4$  gewonnen. 10–11 Tiere jeder Generation gelangten zur Untersuchung, der Rest diente der Aufzucht. Nach Entwöhnung der Tiere einer jeden Generation erfolgte die Haltung für 7–9 Wochen in Einzelkäfigen unter Standardbedingungen. Futter und Trinkwasser wurden ad libitum verabreicht. Das  $\gamma$ -Tocopherol erhielten die Tiere der Generation  $F_0$ – $F_3$  mit dem Futter. In der  $F_4$ -Generation wurde DL- $\gamma$ -Tocopherol (ca. 1,5 mg in 70 %igem Ethanol gelöst) subkutan jeden zweiten Tag über 8 Wochen injiziert. Das Futter der Tiere von  $F_4$  war entweder das gleiche Grundfutter wie in  $F_0$ – $F_3$ , oder es enthielt zusätzliche Gaben an Methionin (+2,4 g/kg) bzw. Cholin (+4,5 g/kg) als zusätzliche Quellen für Methylgruppen.

Von  $F_1$ – $F_3$  wurden jeweils 6 Tiere zur Ganzkörperanalyse auf  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Tocopherol herangezogen. Für diesen Teil der Untersuchungen wurden die Tiere (Körpergewicht 100–150 g) nach einer Überdosis Chloroform und Vorgefrieren in flüssigem Stickstoff mit Hilfe einer Hochdruckpresse (HYMAG-Presse HWP 30) mit einem Druck von 240 kp/cm<sup>2</sup> auf 5–10 ml zusammengepreßt und nach Gefriertrocknung in

Tab. 1. Futterzusammensetzung (pro kg Futter).

Casein	234	g
Fett (synth. Triglycerid) <sup>a)</sup>	55	g
Linolsäure	5	g
Cholinchlorid	1,5	g
Methionin	0,8	g
Cellulose	25	g
Maisstärke	618,7	g
Mineralstoffmischung <sup>b)</sup>	50	g
Vitaminmischung (außer Vitamin E) <sup>b)</sup>	10	g
DL- $\gamma$ -Tocopherol	78,8	mg

<sup>a)</sup> Aus Maiskeimöl über Molekulardestillation gewonnen, PFS-Gehalt 60 %, Unverseifbares 0,4 %, Tocopherole < 1 mg/100 g Fett.

<sup>b)</sup> Genaue Zusammensetzung in Schäfer H (1983) Beitrag zur Wirkungsweise von Tocopherolen, Ubichinon und  $\beta$ -Sitosterin. Diss. Gießen, S. 42.

einem Braun-Mixer MX 32 mehrmals homogenisiert. Es wurden dann aliquote Teile entnommen und analysiert. Von weiteren 4–6 Tieren je Generation (außer  $F_1$ ) wurden Proben von Serum, Erythrozyten, Leber, Lunge, Herz, Darm (oberer Dünndarm, unterer Dickdarm), Testes bzw. Uterus sowie Kot entnommen und auf Tocopherole analysiert.

Die Tocopherolbestimmung in den entnommenen Proben erfolgte nach Lipidextraktion mit Chloroform/Methanol (2:1) (außer Serum) und Verseifung mit KOH (12) mittels HPTLC nach einer Modifikation der Methode von Bieri und Prival (1). Für Einzelheiten über die bei der Analyse einzelner Gewebe und Organe erfolgten Änderungen siehe Kim 1985 (9).

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte mit der einfaktoriellen Varianzanalyse mit dem Anschlußtest nach Scheffé sowie dem t-Test im Rechenzentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen.

### Ergebnisse und Diskussion

Bis zur vierten Filialgeneration waren Wachstum und Fortpflanzungsfähigkeit normal, die Wurfgröße lag bei 7–10 gesunden, normalentwickelten Jungtieren. Im Laufe der Untersuchung wurden keine äußerlichen Auffälligkeiten sowie nach Obduktion keine Veränderungen an Organen von Thorax und Abdomen festgestellt, es traten auch keine Todesfälle auf.

Die Ergebnisse der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherolanalyse im Gesamtkörper sowie in den Geweben und Organen der Generationen  $F_1$ – $F_4$  sind in den Tabellen 2–4 dargestellt. Aus den ermittelten Konzentrationen an  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol wurden für das jeweils untersuchte Gewebe bzw. Organ zur besseren Vergleichbarkeit das Verhältnis  $\alpha$ - zu  $\gamma$ -Tocopherol ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ) und die Vitamin-E-Wirksamkeit ( $\mu\text{g } \alpha\text{-Tocopheroläquivalente} = \mu\text{g } \alpha\text{-Tocoph-$

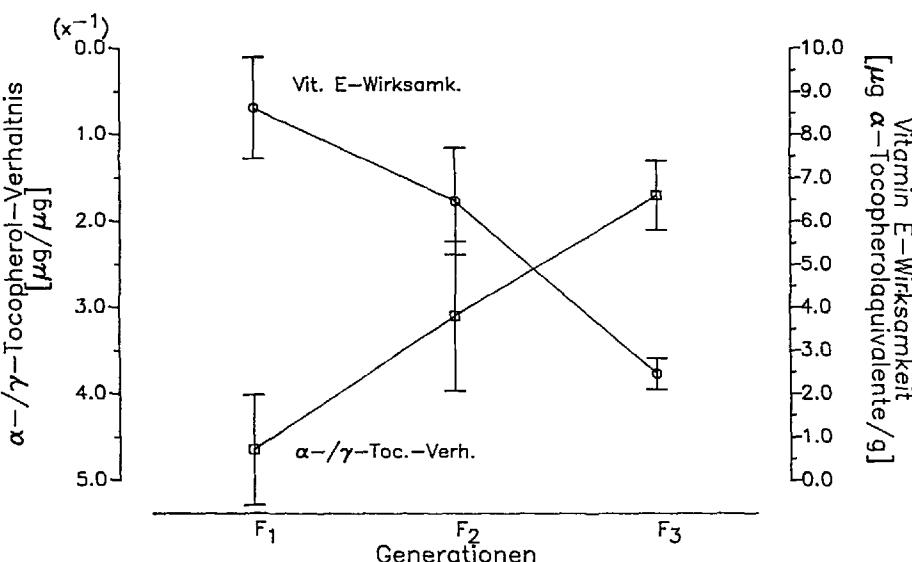


Abb. 3. Gegenläufige Entwicklung der Vitamin-E-Wirksamkeit und der Effizienz der  $\gamma$ -Tocopheroltransformation bei Ratten über drei Generationen.

rol +  $0,25 \cdot \mu\text{g} \gamma\text{-Tocopherol}$ ) (11) errechnet. Bei der  $F_1$ -Generation wurde die Darstellung auf die Ergebnisse der Ganzkörperanalyse beschränkt.

Im Gesamtkörper sowie in den untersuchten Gewebs- und Organproben aller Generationen war  $\alpha$ -Tocopherol in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar. Die Befunde von Emmel und La Celle (5) von 1959, die im Rahmen von Untersuchungen an Tieren einer Generation (nach vorliegender Versuchsanordnung der Elterngeneration entsprechend) ermittelt wurden, werden bestätigt.

Gemessen an den Ergebnissen der Ganzkörperanalyse nahm die Vitamin-E-Wirksamkeit von  $F_1$  bis  $F_3$  ab: in  $F_2$  betrug sie 75 % und in  $F_3$  nur

Tab. 2. Biotransformation von  $\gamma$ -Tocopherol. Gehalte an  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol, das  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Tocopherolverhältnis und die Vitamin-E-Wirksamkeit von Ratten der Filialgenerationen  $F_1$ ,  $F_2$  und  $F_3$ . Vitamin-E-Versorgung erfolgte oral in Form von DL- $\gamma$ -Tocopherol.

Gewebe/Organe	$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu\text{g/g}$ ]	$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu\text{g/g}$ ]	$\alpha$ -/ $\gamma$ -Toc.- Verhältnis [ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ]	errechnete Vitamin-E- Wirksamkeit [ $\mu\text{g} \alpha$ -Toc.- äq./ $\text{g}^{(3)}$ ]
$F_1$ (Grunddiät, $\gamma$ -Toc.: oral) <sup>1)</sup>				
Gesamtkörper <sup>(2)</sup>	$3,97 \pm 0,32$	$18,54 \pm 3,63$	1:4,6	$8,61 \pm 1,18$
$F_2$ (Grunddiät, $\gamma$ -Toc.: oral) <sup>1)</sup>				
Gesamtkörper <sup>(2)</sup>	$3,76 \pm 1,07$	$10,80 \pm 0,97$	1:3,1	$6,45 \pm 1,23$
Serum <sup>(4)</sup>	$0,28 \pm 0,06^{(*)}$	$2,85 \pm 0,07^{(*)}$	1:10,5	$0,99 \pm 0,07^{(*)}$
Erythr. <sup>(4)</sup>	$0,43 \pm 0,41$	$2,69 \pm 0,25^{(*)}$	1:6,3	$1,10 \pm 0,09^{(*)}$
Leber	$0,47 \pm 0,04^{(*)}$	$4,56 \pm 0,10$	1:9,8	$1,61 \pm 0,06$
Herz	$1,57 \pm 0,24$	$12,36 \pm 0,74$	1:8,0	$4,66 \pm 0,41$
Dickdarm	$1,24 \pm 0,08^{(*)}$	$9,57 \pm 0,81^{(*)}$	1:7,7 <sup>(*)</sup>	$3,63 \pm 0,26^{(*)}$
Lunge	$2,81 \pm 0,18^{(*)}$	$9,41 \pm 0,51^{(*)}$	1:3,4	$5,16 \pm 0,15^{(*)}$
Uterus	$1,39 \pm 0,30$	$5,16 \pm 1,24$	1:3,7	$2,68 \pm 0,61$
Kot <sup>(2)</sup>	$12,23 \pm 0,26$	$29,29 \pm 1,16$	1:2,4 <sup>(*)</sup>	$19,55 \pm 0,53$
$F_3$ (Grunddiät, $\gamma$ -Toc.: oral) <sup>1)</sup>				
Gesamtkörper <sup>(2)</sup>	$1,75 \pm 0,43$	$2,85 \pm 0,18$	1:1,7	$2,46 \pm 0,36$
Serum <sup>(4)</sup>	$0,14 \pm 0,03^{(*)}$	$1,63 \pm 0,10^{(*)}$	1:12,1	$0,55 \pm 0,05^{(*)}$
Erythr. <sup>(4)</sup>	$0,21 \pm 0,14$	$1,23 \pm 0,23^{(*)}$	1:5,9	$0,52 \pm 0,17^{(*)}$
Leber	$0,34 \pm 0,09^{(*)}$	$4,18 \pm 0,98$	1:12,9	$1,38 \pm 0,27$
Herz	$1,42 \pm 0,09$	$11,91 \pm 1,64$	1:8,4	$4,40 \pm 0,46$
Dickdarm	$0,98 \pm 0,21^{(*)}$	$5,29 \pm 1,71^{(*)}$	1:5,5 <sup>(*)</sup>	$2,30 \pm 0,54^{(*)}$
Lunge	$2,08 \pm 0,67$	$6,82 \pm 0,88^{(*)}$	1:3,5	$3,78 \pm 0,86^{(*)}$
Testes	$1,18 \pm 0,39$	$2,37 \pm 1,53$	1:2,0	$1,78 \pm 0,63$
Kot <sup>(2)</sup>	$13,61 \pm 1,26$	$28,63 \pm 2,76$	1:2,1 <sup>(*)</sup>	$20,76 \pm 1,93$

<sup>1)</sup> 78,8 mg DL- $\gamma$ -Tocopherol/kg Futter

<sup>2)</sup> [ $\mu\text{g/g}$  Trockensubstanz]

<sup>3)</sup> Vitamin-E-Wirksamkeit ( $\mu\text{g} \alpha$ -Tocopheroläquivalente) =  $\mu\text{g} \alpha$ -Tocopherol +  $0,25 \cdot \mu\text{g} \gamma$ -Tocopherol

<sup>4)</sup> [ $\mu\text{g/ml}$ ]

<sup>(\*)</sup> Unterschiede zwischen  $F_2$  und  $F_3$  signifikant bei  $p < 0,05$

<sup>(o)</sup>  $\alpha$ -Toc.:  $F_1$ ,  $F_2 > F_3$ ;  $\gamma$ -Toc., Transformationsrate:  $F_1 < F_2$ ,  $F_3$ ; Vitamin-E-Wirksamkeit:  $F_1 > F_2 > F_3$

29 % von  $F_1$ . Die Transformation von  $\gamma$ - zu  $\alpha$ -Tocopherol verhielt sich genau umgekehrt. Das relativierte errechnete Verhältnis  $\alpha$ -: $\gamma$ -Tocopherol in  $F_1$ ,  $F_2$  und  $F_3$  betrug 100 %, 123 % und 268 %. Mit abnehmendem Vitamin-E-Speicher nahm die Effizienz des Körpers,  $\alpha$ -Tocopherol aus dem verfügbaren  $\gamma$ -Tocopherol zu bilden, sehr deutlich zu (Abb. 3).

Auch in den Geweben und Organen wurden in  $F_2$  und  $F_3$  unterschiedliche  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Tocopherolverhältnisse festgestellt. Am niedrigsten waren sie in Serum und Leber, gefolgt von Myokard, Erythrozyten und Dickdarm. Am höchsten waren die Transformationsraten in Lunge und Gonaden, sie lagen um Faktor 2-3 bzw. 4-6 höher als in Leber und Serum. Die errechneten Vitamin-E-Wirksamkeiten der Gewebe und Organe beider Generationen unterstreichen weitgehend dieses Ergebnis. Für beide Generationen gilt diesbezüglich folgende Reihenfolge: Lunge, Herz > Dickdarm > Uterus bzw. Testes > Leber > Erythrozyten, Serum (Tab. 2).

Diese Befunde erlauben die Annahme, daß die Gewebe und Organe des Körpers einen spezifischen Bedarf an  $\alpha$ -Tocopherol haben und sie befähigt sind, das benötigte  $\alpha$ -Tocopherol aus dem vorliegenden  $\gamma$ -Tocopherol zu bilden.

Im Kot der Tiere von  $F_2$  und  $F_3$  wurden die höchsten  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Tocopherolverhältnisse festgestellt (1:2,4 bzw. 1:2,1) (Tab. 2). Dies beweist, daß die  $\gamma$ -Tocopheroltransformation enteral durch die Darmflora in einer solchen Effizienz erfolgt, welche die aller Gewebe und Organe übertrifft.

Im Hinblick auf das relativ gute Abschneiden des Dickdarms mit einem mittleren  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Tocopherolverhältnis und ebenso einer mittleren Vitamin-

Tab. 3. Biotransformation von  $\gamma$ -Tocopherol. Einfluß subkutaner Verabreichung von DL- $\gamma$ -Tocopherol auf den Gehalt an  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol, das  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Tocopherolverhältnis und die Vitamin-E-Wirksamkeit in Geweben und Organen von Ratten der  $F_4$ -Generation.

Gewebe/Organe	$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu$ g/g]	$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu$ g/g]	$\alpha$ -/ $\gamma$ -Toc.- Verhältn. [ $\mu$ g/ $\mu$ g]	errechnete Vitamin-E- Wirksamkeit [ $\mu$ g $\alpha$ -Toc.- äq./g] <sup>3)</sup>
$F_4$ (Grunddiät, $\gamma$ -Toc.: subkutan) <sup>1)</sup>				
Serum <sup>4)</sup>	0,24 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,11 <sup>*)</sup>	1:2,7 <sup>*)</sup>	0,39 $\pm$ 0,10 <sup>*)</sup>
Leber	1,53 $\pm$ 0,52 <sup>*)</sup>	32,97 $\pm$ 3,60 <sup>*)</sup>	1:23,3 <sup>*)</sup>	9,77 $\pm$ 1,39 <sup>*)</sup>
Herz	13,15 $\pm$ 4,23 <sup>*)</sup>	3,71 $\pm$ 1,66 <sup>*)</sup>	1:0,3 <sup>*)</sup>	14,13 $\pm$ 3,92 <sup>*)</sup>
Dickdarm	1,31 $\pm$ 0,42	3,70 $\pm$ 1,83	1:2,9	2,24 $\pm$ 0,77
Lunge	1,05 $\pm$ 0,12 <sup>*)</sup>	5,36 $\pm$ 0,72 <sup>*)</sup>	1:5,2 <sup>*)</sup>	2,39 $\pm$ 0,20 <sup>*)</sup>
Uterus	4,95 $\pm$ 1,07	13,42 $\pm$ 1,21	1:2,9	8,30 $\pm$ 0,87
Dünndarm	0,72 $\pm$ 0,09	5,31 $\pm$ 0,89	1:7,4	2,04 $\pm$ 0,29
Kot <sup>2)</sup>	2,62 $\pm$ 0,70	25,75 $\pm$ 4,91	1:9,1	9,06

<sup>1)</sup> 78,8 mg DL- $\gamma$ -Tocopherol/kg Futter

<sup>2)</sup> [ $\mu$ g/g Trockensubstanz]

<sup>3)</sup> Vitamin-E-Wirksamkeit ( $\mu$ g  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente) =  $\mu$ g  $\alpha$ -Tocopherol + 0,25  $\cdot$   $\mu$ g  $\gamma$ -Tocopherol

<sup>4)</sup> [ $\mu$ g/ml]

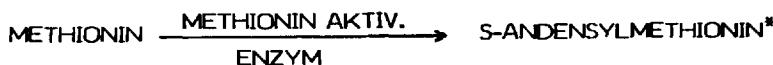
<sup>\*)</sup> Unterschiede zu  $F_3$  (Tab. 2) signifikant bei  $p < 0,05$

E-Wirksamkeit erhebt sich die Frage, ob ein Teil des enteral entstandenen  $\alpha$ -Tocopherols von der Wand des Dickdarms aufgenommen wurde.

Da bekannt ist, daß die Tocopherolabsorption im Dünndarm stattfindet und dem Dickdarm diesbezüglich praktisch keine Bedeutung zukommt, wurde in  $F_4$  die Rolle der Darmflora bei der Umwandlung des  $\gamma$ -Tocopherols etwas genauer untersucht. Unter Umgehung der Darmflora wurde das  $\gamma$ -Tocopherol subkutan injiziert. Die injizierte Menge orientierte sich an der durchschnittlichen oralen Aufnahme anderer Gruppen dieser Generation. Die ermittelten  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Tocopherolverhältnisse im Kot dieser Tiere waren nach 8 Wochen um etwa Faktor 4 schlechter als in  $F_2$  und  $F_3$ . Dieses wird dadurch erklärt, daß – bedingt durch die Umgehung des Intestinaltraktes – entschieden weniger  $\gamma$ -Tocopherol zur Umwandlung als Substrat vorlag. Die Effizienz des Dickdarms,  $\gamma$ -Tocopherol zu transformieren, blieb auch in diesem Versuchabschnitt auf gleicher Höhe wie in den vorangegangenen Generationen  $F_2$  und  $F_3$  (Tab. 3).

Unter subkutaner  $\gamma$ -Tocopherolapplikation entfielen die Absorptions-schranken, wodurch die Organe mit  $\gamma$ -Tocopherol besser versorgt waren als nach oraler Verabreichung. Mit Ausnahme von Leber, Lunge und Dünndarm (in  $F_2$  und  $F_3$  nicht untersucht) waren die  $\gamma$ -Tocopherolumwandleraten besser als in  $F_2$  und  $F_3$ . Höchste Effizienz wurde im Herzmuskel gefunden (1:0,3). Die errechneten Vitamin-E-Wirksamkeiten entsprachen folgender Reihenfolge: Herz, Leber, Uterus > Lunge, Dick- und Dünndarm > Serum.

Bei der Transformation von  $\gamma$ - zu  $\alpha$ -Tocopherol könnte es sich um eine Übertragung einer Methylgruppe auf das  $\gamma$ -Tocopherolmolekül handeln. Eine Methylierungsreaktion also, welche im Stoffwechsel des Tierkörpers vielerorts abläuft. Als Methylgruppendonator an  $C_5$  und  $C_7$  des Chromanrings in Pflanzen wurde mehrfach Methionin nachgewiesen (18). Die denkbare Übertragung einer  $CH_3$ -Gruppe könnte sich auch im Tierkörper als eine Transmethylierungsreaktion wie folgt vollziehen (Abb. 4):



(\* S-AM ist energiereich und somit leicht für  
Methylübertragung verfügbar)

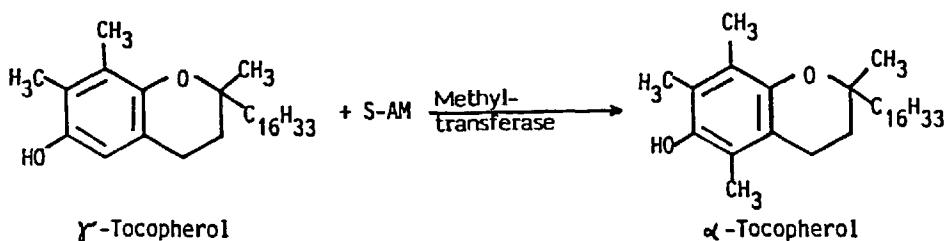


Abb. 4. Transmethylierungsreaktion von  $\gamma$ - zu  $\alpha$ -Tocopherol.

Der Frage, ob die Methylierung des  $\gamma$ -Tocopherols im Körper durch ein höheres Angebot an Methylgruppen verbessert werden könnte, wurde in der Generation  $F_4$  nachgegangen. Zwei Gruppen zu je vier Tieren erhielten mit der Grunddiät Methionin und Cholin als Methylgruppendonatoren in der jeweils dreifachen Menge wie in  $F_2$  und  $F_3$ . Die  $\gamma$ -Tocopherolversorgung erfolgte wie in  $F_2$  und  $F_3$  oral.

Durch Gaben an Methionin und Cholin wurden die Transformationsraten des  $\gamma$ -Tocopherols in Leber, Darm, Serum, Testes und Herz begünstigt gegenüber den Generationen  $F_2$  und  $F_3$  (Tab. 4). Dabei entfalteten beide Methylgruppendonatoren annähernd die gleiche positive Wirkung. Mit beiden wurden die niedrigsten  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Tocopherolverhältnisse in Leber und Lunge, die höchsten in Testes und Herz festgestellt. Bemerkenswert ist die Feststellung, daß der Herzmuskel auch die höchste Vitamin-E-Wirksamkeit in allen untersuchten Generationen aufwies. Von  $F_2$  bis  $F_4$  (außer der Gruppe unter subkutaner  $\gamma$ -Tocopherolapplikation) konnte der Herzmuskel sein Potential an Vitamin-E-Wirksamkeit aufrechterhalten.

Tab. 4. Biotransformation von  $\gamma$ -Tocopherol. Einfluß von Methionin- und Cholingenben auf die Effizienz der  $\gamma$ -Tocopheroltransformation und Vitamin-E-Wirksamkeit in Geweben und Organen von Ratten der  $F_4$ -Generation.

Gewebe/Organe	$\alpha$ -Tocopherol [ $\mu$ g/g]	$\gamma$ -Tocopherol [ $\mu$ g/g]	$\alpha$ -/ $\gamma$ -Toc.- Verhältn. [ $\mu$ g/ $\mu$ g]	errechnete Vitamin-E- Wirksamkeit [ $\mu$ g $\alpha$ -Toc.- äq./g] <sup>3)</sup>
$F_4$ (Grunddiät, $\gamma$ -Toc.: oral <sup>1)</sup> ) + Methionin				
Serum <sup>4)</sup>	0,15 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,11	1:1,5	0,20 $\pm$ 0,03
Leber	0,89 $\pm$ 0,04	6,63 $\pm$ 1,69	1:7,5	2,55 $\pm$ 0,42
Herz	3,63 $\pm$ 1,05	2,75 $\pm$ 1,74	1:0,7	4,31 $\pm$ 1,48
Dickdarm	1,15 $\pm$ 0,46	2,55 $\pm$ 1,23	1:2,5	1,78 $\pm$ 0,60
Lunge	1,04 $\pm$ 0,22	3,60 $\pm$ 0,92	1:3,6	1,94 $\pm$ 0,29
Testes	0,76 $\pm$ 0,15	0,58 $\pm$ 0,20	1:0,8	0,91 $\pm$ 0,20
Dünndarm	0,82 $\pm$ 0,18	2,92 $\pm$ 1,06	1:3,8	1,55 $\pm$ 0,21
Kot <sup>2)</sup>	2,82 $\pm$ 0,38	21,69 $\pm$ 1,60	1:7,7	8,24
$F_4$ (Grunddiät, $\gamma$ -Toc.: oral <sup>1)</sup> ) + Cholin				
Serum <sup>4)</sup>	0,19 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,05	1:1,3	0,25 $\pm$ 0,05
<sup>E</sup> rythr. <sup>4)</sup>	0,15 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,04	1:2,6	0,22 $\pm$ 0,08
Leber	0,82 $\pm$ 0,26	5,72 $\pm$ 2,14	1:6,9	2,25 $\pm$ 0,79
Herz	3,21 $\pm$ 0,25	3,68 $\pm$ 1,15	1:1,2	4,12 $\pm$ 0,33
Dickdarm	0,91 $\pm$ 0,38	1,65 $\pm$ 0,90	1:2,0	1,33 $\pm$ 0,48
Lunge	1,01 $\pm$ 0,19	3,93 $\pm$ 0,69	1:3,9	1,99 $\pm$ 0,35
Testes	0,72 $\pm$ 0,19	0,73 $\pm$ 0,33	1:1,0	0,90 $\pm$ 0,27
Dünndarm	0,97 $\pm$ 0,20	3,48 $\pm$ 0,51	1:3,7	1,84 $\pm$ 0,21
Kot <sup>2)</sup>	3,35 $\pm$ 0,47	24,45 $\pm$ 3,67	1:7,8	9,46

Unterschiede zwischen  $F_4$  + Methionin und  $F_4$  + Cholin nicht signifikant ( $p < 0,05$ )

<sup>1)</sup> 78,8 mg DL- $\gamma$ -Tocopherol/kg Futter

<sup>2)</sup> [ $\mu$ g/g Trockensubstanz]

<sup>3)</sup> Vitamin-E-Wirksamkeit ( $\mu$ g  $\alpha$ -Tocopheroläquivalente) =  $\mu$ g  $\alpha$ -Tocopherol + 0,25  $\cdot$   $\mu$ g  $\gamma$ -Tocopherol

<sup>4)</sup> [ $\mu$ g/ml]

Die Ergebnisse dieses aufwendigen Generationsversuchs beweisen, daß eine Langzeitadaptation des tierischen Organismus an  $\gamma$ -Tocopherol als alleinige Vitamin-E-Quelle möglich ist. Das Wachstum der Tiere und ihre volle Fortpflanzungsfähigkeit waren normal. Die Ergebnisse beweisen auch, daß im Rahmen dieser Adaptation und mit fortschreitender Verarmung des Körpers an Vitamin E  $\gamma$ -Tocopherol als unmittelbare Vorstufe der Synthese von  $\alpha$ -Tocopherol dient. Dieser Syntheseschritt, der in höheren Pflanzen nachgewiesen werden konnte, erfolgt auch im tierischen Körper, wahrscheinlich über eine Transmethylierungsreaktion in den verschiedenen Geweben und Organen, und zwar gemäß ihrem spezifischen Bedarf an  $\alpha$ -Tocopherol.

### Danksagung

Die Autoren danken der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, für die großzügige Bereitstellung von DL- $\gamma$ -Tocopherol.

### Literatur

1. Bieri JG, Prival EL (1965) Serum vitamin E determined by thin layer chromatography. Proc Soc Exp Biol Med 120:106-114
2. Botham KM, Pennock JF (1972) The biosynthesis of tocopherols generated compounds in the blue-green algae *Aananaena variabilis*. Biochem J 122:127-128
3. Dju MY, Quaife ML, Harris PL (1950) Utilization of pure  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -Tocopherol by laying hene. Am J Physiol 160:259
4. Elmadfa I, Bosse W (Hrsg) (1985) Vitamin E: Eigenschaften, Wirkungsweise und therapeutische Bedeutung. Wiss Verlagsgesellschaft, Stuttgart
5. Emmel VM, Celle PL (1959) Observations concerning intestinal absorption of  $\gamma$ -tocopherol and its conversion to  $\alpha$ -tocopherol. Am Assoc of Anatomists Meeting, Seattle; In: Anatomical Record 133:376
6. Fiedler E, Soll J, Schulz G (1982) The formation of homgentisate in the biosynthesis of tocopherol and plastoquinone in spinach chloroplasts. Planta 155:511
7. Isler O, Brubacher G (Hrsg) (1982) Vitamine I. Thieme Verlag, Stuttgart
8. Kasperek S (1980) Chemistry of tocopherols and tocotrienols. In: Machlin LJ (ed) Vitamin E; A comprehensive treatise. Dekker, New York, pp 7-65
9. Kim SW (1985) Einfluß von Polysorbat-(Tween-)80 auf Absorption und Retention von  $\alpha$ -Tocopherol. Dissertation Gießen
10. Landvogt C, Elmadfa I (1986) Einfluß von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol sowie Cholesterin auf die Lipidperoxidation. Z Ernährungswiss 25:47-62
11. Marshall S, Morris SR, Threlfall DR (1985) Biosynthesis of tocopherols: A reexamination of the biosynthesis and metabolism of 2-Methyl-6-phytol-1,4-Benzoquinol. Phytochemistry Vol 24, Nr 8:1705-1711
12. Merven L, Morton RA (1959) Unsaponifiable fraction of lipid from normal and diseased kidney. Biochem J 72:106-114
13. Pennock JF, Threlfall DR (1983) In: Porter JW, Spurgeon SL (eds) Biosynthesis of isoprenoid compounds. John Wiley and sons, New York, Vol 2, pp 191-303
14. Schäfer H, Elmadfa I (1984) Relative bioavailability of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol calculated from respiration parameters in rat liver mitochondria. Metabol 28:297-304
15. Schulz G, Fiedler E, Soll J, Schulze-Siebert D (1985) Synthesis of prenylquinones in spinach chloroplasts. Physiol Plants 64:123-129

16. Schulz G, Soll J (1980) Die Biosynthese von  $\alpha$ -Tocopherol, Phyllochinon und anderen Prenylchinonen in der Pflanze: Zur Frage des Ausbleibens der Biosynthese beim Tier – eine Übersicht. Deutsche Tierärztl Wochenschr 87:410–424
17. Soll J, Kemmerlink M, Schulz G (1980) Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfraction. Arch Biochem Biophys 204:544–550
18. Threlfall DR, Griffith WT, Goodwin TW (1967) Biosynthesis of the prenyl site chain of plastoquinone and related compounds in maize and barley shoot. Biochem J 103:831–851
19. Watanabe T, Wada M, Takenehi T, Arai S (1981) Absence of interconversion of tocopherols in rainbow trout. Nihon-Suisan-Gakkai (Tokyo) 47:11
20. Whistance GR, Threlfall DR (1970) Biosynthesis of phytoquinones, tocopherols and  $\alpha$ -Tocopherylquinone in higher plants, green algae and blue-green algae. Biochem Biophys Res Commun 117:593–600
21. Whistance GR, Threlfall DR, Goodwin TW (1966) Incorporation of (G- $^{14}$ C) shikimate and (I- $^{14}$ C) para-hydroxybenzoate into phytoquinines and chromanoles. Biochem Biophys Res Commun 23:849–853

Eingegangen 17. Januar 1989

Für die Verfasser:

I. Elmadafa, Institut für Ernährungswissenschaft, Justus-Liebig-Universität, Wilhelmstraße 20, D-6300 Gießen